



Molecular mechanisms of endosymbiosis between cnidarian animals and symbiotic algae

著者	石井 悠
号	17
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	生第31号
URL	http://hdl.handle.net/10097/00126476

氏名（本籍地）	いしい ゆう 石井 悠
学位の種類	博士（生命科学）
学位記番号	生第 31 号
学位授与年月日	令和元年9月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
論文題目	東北大学大学院生命科学研究科 生命機能科学専攻修了 Molecular mechanisms of endosymbiosis between cnidarian animals and symbiotic algae (サンゴ共生藻と刺胞動物との細胞内共生の分子メカニズム)
博士論文審査委員	(主査) 教授 河田 雅圭 教授 牧野 能士 教授 田村 宏治

論文内容の要旨

Symbiosis is a living state in which individuals of multiple species coexist interactively and sympatrically. Symbiotic relationship is considered to contribute to the enhancement of the survival fitness or the adaptation to new environment by the individuals involved in the system. Some cnidarians such as corals and sea anemones live with Symbiodiniaceae dinoflagellate algae by harboring the algae in their own endodermal cells (endosymbiosis). It is presumed that the cnidarians provide a stable habitat and inorganic nitrogen compound and carbon dioxide to the algae as “host”, while the algae provide photosynthetic products to the host as “symbiont”. This symbiotic relationship is thought to be advantageous in oligotrophic tropical and subtropical oceans, but can be vulnerable to environmental changes. Recent studies have revealed huge impact of elevated seawater temperature on the collapse of their symbiosis (Hughes *et al.* 2017). Nevertheless, the molecular mechanism of the symbiosis between the cnidarians and the dinoflagellate algae are still unknown. To gain insights into the molecular interaction in the symbiosis, here I analyzed the candidate genes involving in symbiotic state changes, i.e. changes between symbiotic and apo-symbiotic (symbiont free) states (Chapter 1) and established mutant symbiont algal strains as a way to test their functions (Chapter 2). As experiment materials, I used the model symbiotic sea anemone *Exaiptasia diaphana* with its Symbiodiniaceae symbiont algae. *E. diaphana* has a substantial advantage in easiness to maintain in laboratory even if they are under the apo-symbiotic state and to manipulate the symbiotic state by experimentally switching between symbiotic and apo-symbiotic conditions. In Chapter 1, I performed transcriptomic analyses under multiple conditions using the symbiotic and apo-symbiotic *E. diaphana*. Comparative analysis of expression profiles under multiple conditions highlighted candidate genes potentially important in the symbiotic state transition under heat-induced bleaching. Many of these genes were functionally associated with carbohydrate and protein metabolisms in lysosomes. Symbiont algal genes differentially expressed *in hospite* encode proteins related to heat shock response, calcium signaling, organellar protein transport, and sugar metabolism. These results suggest that heat stress alters gene expression in both the hosts and symbionts. In particular, heat stress may affect the lysosome-mediated degradation and transportation of substrates such as carbohydrates through the membrane of symbiosome (phagosome-derived organelle harboring symbiont), which potentially might attenuate the stability of symbiosis and lead to bleaching-associated symbiotic state transition. Although gene introduction and manipulation techniques are necessary to directly test this hypothesis, any methods in both *E. diaphana* and Symbiodiniaceae had not been readily available. Therefore, in Chapter 2, I isolated Symbiodiniaceae mutants to use for transformation screening. *Breviolum* sp. (Symbiodiniaceae) was cultured in the presence of 5-fluoroorotic acid (5FOA), which inhibits the growth of wild type cells expressing *URA3* encoding orotidine-5'-monophosphate decarboxylase, and isolated spontaneous mutant cells that require uracil for growth. An obtained mutant cell line had a point mutation (splicing variation) in the *URA3* gene, which was confirmed by sequence analyses and genetic complementation tests in the yeast. This mutant

maintained a symbiotic relationship with *E. diaphana* in sea water containing uracil but didn't without uracil. This *URA3* mutant will be a useful tool for screening Symbiodiniaceae transformants, both ex and in *hospite*, as survival in the absence of uracil is possible only upon successful introduction of a functional *URA3* gene. In conclusion, these results have provided a foundation for gene function analysis for candidate genes in this thesis in future studies.

論文審査結果の要旨

石井悠氏の提出した論文は、サンゴ共生藻である褐虫藻をモデル共生藻に、刺胞動物セイタカイソギンチャクをモデル宿主として用い、これまで研究の進んでいなかった共生関係の維持に関する分子メカニズムの理解を深めるための研究を行った結果をまとめたものである。

本論文では、第一章において、ゲノムデータに基づく全遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）をによる共生状態の変化に関わる遺伝子の探索を行い、共生体、宿主の双方のゲノムから、環境ストレス下で共生状態が不安定化すると考えられる条件特異的に発現変動する遺伝子を同定した。これらが共生の崩壊に関わる新規候補遺伝子であり、特にそれら遺伝子に推測される機能から、共生体、宿主の双方における糖代謝が共生安定性に関するシグナルとして働くという、今後の検証研究を動機付ける斬新な仮説を提唱した。第二章では、共生研究に資する新規技術の開発を報告している。一つには、遺伝子組換え技術の未発達な褐虫藻を用いて、栄養要求性の突然変異株を単離し、これまで困難とされてきた外来遺伝子導入を容易にする株を開発した。また、画像解析やモデル宿主に共生させた褐虫藻の数の変動や共生の度合いを定量的に測定する技術を開発した。この株と画像解析技術を組み合わせることで、共生体が十分に増殖できない環境では、安定な共生を営むことが難しいことを初めて定量的に示した。

以上の結果を基に、総合討論では、共生体の増殖が宿主の組織レベルで見た場合の安定性に寄与し、活発な糖分子のやり取りが分子レベルで見た際の安定性に関与するが、高温などの環境ストレス下ではそれぞれの過程が阻害されることで、全体としての共生安定性が減少する、という二重構造の仮説を提唱している。こうした仮説は現在進行中の形質転換技術の開発により検証することが可能であり、第一章と第二章の成果を合わせて将来的な研究へとつながっていく全体の構成や発展性などを鑑みても、博士論文として適当であると言える。これらのことは、石井氏が自立して研究活動を行うに必要な高度の研究能力と学識を有することを示している。したがって、石井悠氏提出の論文は、博士（生命科学）の博士論文として合格と認める。